

Aus dem II. Anatomischen Institut der Freien Universität Berlin
Direktor: Professor Dr. med. Willy Schwarz

MINERALISATION DES VORKNORPELS

**Das elektronenmikroskopische Bild
des verkalkenden Vorknorpels
bei Mäuseembryonen**

INAUGURAL-DISSERTATION

zur

**Erlangung der medizinischen Doktorwürde
an den**

Medizinischen Fachbereichen der Freien Universität Berlin

vorgelegt von

Astrid Wodtke

aus Mohrungen

1972

Aus dem II. Anatomischen Institut der Freien Universität Berlin
Direktor: Professor Dr. med. Willy Schwarz

MINERALISATION DES VORKNORPELS.
Das elektronenmikroskopische Bild
des verkalkenden Vorknorpels
bei Mäuseembryonen.



Inaugural-Dissertation
zur
Erlangung der medizinischen Doktorwürde
an den
Medizinischen Fachbereichen der Freien Universität Berlin

vorgelegt von
Astrid Wodtke
aus Mohrungen

Referent: Professor Dr. med. Hans-Joachim Merker
Korreferent: Professor Dr. med. dent. Hans Lenz



Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen
Fachbereiche der Freien Universität Berlin

Promoviert am: 5. Mai 1972

Inhaltsverzeichnis

Einleitung.....1

Material und Methode.....7

Befunde.....9

Diskussion.....16

Zusammenfassung.....22

Literatur.....24

Bildmaterial.....31



Digitized by the Internet Archive
in 2026

EINLEITUNG

Die Entwicklung des Skeletts bei den Säugetieren stellt einen komplizierten Vorgang dar, der aus einer Fülle von Einzelschritten zusammengesetzt ist, und in Abhängigkeit von der Lokalisation nach einem unterschiedlichen Muster ablaufen kann (BARGMANN 1962. BUCHER 1962. LANGMAN 1970. MERKER 1972. STARCK 1965). Ein grosser Teil der knöchernen Skelettstücke entsteht auf dem Boden einer knorpelig vorgebildeten Schablone. Dabei bildet sich zunächst wie bei allen Knochenteilen ein dichtgepacktes epitheloides Blastem. Im Zentrum dieses mesenchymalen Zellverbandes beginnen die Zellen dann mit der Synthese und Sekretion einer Interzellulärsubstanz. Sie lagert sich zwischen den Zellen ab und drängt sie dadurch auseinander. Auf diese Weise entsteht der typische Vorknorpel mit einer mächtig entwickelten glasigen Interzellulärsubstanz und isoliert liegenden Knorpelzellen (GIESEKING 1959. KNESE u. KNOOP 1961. MERKER 1966, 1968, 1972. SCHWARZ 1965, 1966). Diese erste Generation von Stützgewebszellen verändert sich durch Glykogeneinlagerung, Glykogenauflösung und Vakuolenbildung. Die dabei ablaufende Zellblähung ist schliesslich so ausgeprägt, dass die Zellen platzen und zugrundegehen (Blasenknorpel). Gleichzeitig spielen sich morphologisch deutlich fassbare Veränderungen an der Interzellulärsubstanz des Knorpels ab. In zunehmendem Masse lagern sich

nun Calcium-Apatit-Kristalle ein und mauern so die absterbenden Knorpelzellen ein (MERKER 1968. ROMEIS 1911). Während sich diese Vorgänge im Bereich des Vorknorpels abspielen, bildet sich um den diaphysären Bereich der knorpelig vorgebildeten Röhrenknochen eine Knochenmanschette. Zu diesem Zeitpunkt, der durch zugrundegehende Vorknorpelzellen, eine verkalkende Interzellulärsubstanz und den Beginn einer Knochenmanschetten-Bildung charakterisiert ist, sprossen aus dem umgebenden Mesenchym Gefässe und begleitende Zellen in die Anlage des Skelettstückes ein und besiedeln sie mit einer zweiten Generation von Stützgewebszellen, die sowohl das alte Vorknorpelmodell abräumen als auch ein neues Knorpelstück auf dieser Schablone bilden. Es entsteht der sogenannte Ersatzknochen (BERNARD and PEASE 1969. FREUDENBERG and GYÖRGY 1924). Diese Vorgänge laufen offenbar bei allen bisher untersuchten Säugetieren ab. Die Ersatzknochenbildung wird bei Teilen der Schädelbasis und des Schultergürtels, in der Wirbelsäule und im Becken und in allen Röhrenknochen der Extremitäten beobachtet. Der eigentliche Vorgang der Mineralisation ist noch immer unbekannt und deshalb umstritten. Viele Theorien, die erklären sollen, warum Calcium-Apatit sich an umschriebenen und typischen Stellen niederschlägt, sind bisher veröffentlicht worden. Ein grosser Teil davon verdient vorwiegend nur biochemisches Interesse, da morphologische Grundlagen oder Darstellungsmöglichkeiten fehlen. Morphologisch interessant sind folgende Möglichkeiten:

1. Die Fähigkeit der Kollagen-Fibrillen Apatit zu binden;
2. Die Kalkfängereigenschaften von Glucosaminglycanen (GAG);
3. Der Abbau von GAG und anderen Substanzen, die die Apatiteinlagerung verhindern;
4. Die aktive Sekretion von Kalksalzen oder sogar Kalk-Protein-Komplexen durch die Osteoblasten.

Bei diesen Vorgängen spielt möglicherweise ein typisches Enzym eine wichtige Rolle, die unspezifische alkalische Phosphatase. Sie ist histochemisch Überall dort nachzuweisen, wo es zur Mineralisation kommt, zum Beispiel auch in den Bezirken des verkalkenden Vorknorpels (BACHRA et al. 1959. CABRINI 1961. EGER 1961, 1963. DULCE 1960. FLEISCH 1961, 1966. GLIMCHER 1960. LEONARD and SCULLIN 1969. MAJNO and ROUILLER 1951. MC LEAN and BLOOM 1940. NEUMANN and NEUMANN 1953. ROBINSON 1952. SANTANAM 1959. STEINER 1972. STRATES and NEUMANN 1958. TAVES 1965. TELLER et al. 1971. URIST 1966. VEIS et al. 1969. ZAMBOTTI 1957):

Eine elektronenmikroskopische Darstellung dieser Vorgänge ist noch nicht in der Weise gelungen, dass endgültig zu diesem Problem Stellung genommen werden kann (BONUCCI 1967. BERNARD and PEASE 1969. CAMERON 1963. KNESE 1957, 1959, 1963. KNESE u. KNOOP 1958, 1960, 1961. MERKER 1968). Zwar ist in der Umgebung der ersten Calcium-Apatit-Kristallniederschläge häufig eine Verdichtung der Interzellulärsubstanz nachgewiesen worden, die auf Grund ihrer färberischen

Eigenschaften auf eine Konzentration von Mucopolysacchariden schliessen lassen (BONUCCI 1967. MERKER 1968). Andererseits lassen sich aber ohne Zweifel exakte räumliche Beziehungen zu den Kollagenfibrillen nachweisen. Ob allerdings diese räumliche Beziehung tatsächlich primär durch Kollageneigenschaften geprägt wird oder sekundär durch die Mucopolysaccharide in der Fibrillenumgebung, lässt sich nicht allein morphologisch entscheiden (CAMERON 1963). Offenbar gibt es darüberhinaus - vom morphologischen Gesichtspunkt aus gesehen - auch noch verschiedene Formen der Mineralisation.

Im reifen Lamellenknorpel ist die ablaufende Mineralisation von vornherein exakt und in typischer Weise an die Kollagenfibrillen gebunden. In den Anfängen der desmalen Verknöcherung und auch des Geflechtknochens finden wir dagegen keinerlei Beziehungen zu den kollagenen Strukturen. Hier muss, wenn überhaupt, die interfibrilläre Grundsubstanz eine Rolle spielen (MERKER 1972). Die Aktivität der alkalischen Phosphatase ist in beiden Fällen nachzuweisen (TELLER et al. 1971. MAJNO and ROUILLER 1951). Als dritte Form einer Verkalkung könnte ausserdem noch die dystrophische und auch calciphylaktische Mineralisation erwähnt werden. Auch in diesen Fällen findet man keinerlei Hinweis auf eine Beteiligung des Kollagens. Einzelne Kalkniederschläge entstehen sogar intracellulär (GUENTHER u. MERKER 1969. NOVAK u. MERKER 1971).

Eine endgültige Entscheidung müsste deshalb auf Grund dieser morphologischen Befunde mehrere Möglichkeiten

der Mineralisation berücksichtigen.

Schon die alten Histologen konnten nach dem lichtmikroskopischen Bild bei der Verkalkung des Vorknorpels einen deutlichen Unterschied zu den übrigen Verknöcherungsprozessen feststellen. Sie sprechen deshalb nicht von einer Verknöcherung, sondern bewusst von einer Verkalkung. Dieser Vorgang ist aber für den weiteren Verlauf der Skelettentwicklung sehr wichtig, da er offenbar den Reiz für das Einwandern der zweiten Mesenchymzell-Generation zur Bildung des Ersatzknochens darstellt. Unklar ist dabei auch hier noch wie der eigentliche Mineralisationsvorgang in der Grundsubstanz des Vorknorpels vor sich geht. Bestehen Ähnlichkeiten zu einem der geschilderten Mineralisationsvorgänge oder handelt es sich hier einfach um eine dystrophische Verkalkung? Diese letzte Vorstellung über den Mechanismus der Mineralisation liegt nicht so fern, da zur gleichen Zeit die Zellen des Vorknorpels bereits die ersten Zeichen einer Vakuolisierung und Auflösung zeigen.

Unabhängig von diesen feinstrukturellen Problemen ergibt sich bei der Durchsicht der Literatur, dass auch noch im makroskopischen und Lupenbereich Lücken in der vergleichenden Skelettentwicklung bei den verschiedenen Laboratoriumstieren vorhanden sind. Zwar liegen einige eingehende Untersuchungen über die Ersatzknochenbildung bei der Maus und Ratte vor, jedoch existieren keine genauen Angaben über Beginn

und Sequenz der Vorknorpelverkalkung im Gesamtskelett (KEIBEL 1937. STEINER 1972. STRONG 1925. WALKER and WIRTSCHAFTER 1957. YOUSSEF 1969). Ausserdem wurden bisher noch nicht die Stammesunterschiede bei den einzelnen Spezies berücksichtigt. Gerade die Kenntnis dieser frühen Skelettentwicklung in Abhängigkeit von der verwendeten Rasse ergibt aber erst die Möglichkeit die feineren Unterschiede beim Arbeiten mit embryotoxischen und teratogenen Substanzen zu sehen.

In dieser Arbeit untersuchten wir deshalb zunächst den Zeitpunkt und die Reihenfolge des Auftretens des Blasenknorpels als morphologischen Hinweis für den Beginn der Vorknorpelverkalkung mit lichtmikroskopischen Methoden. Darüberhinaus versuchten wir die Verkalkung des Vorknorpels auch elektronenmikroskopisch darzustellen, um den frühen mineralisationsprozess und die Beziehungen der Kalkkristalle zu den elektronenoptisch sichtbaren Strukturen, besonders natürlich zu den Kollagenfilamenten, genauer darstellen zu können.

MATERIAL UND METHODE

Für die folgenden licht- und elektronenmikroskopischen Untersuchungen wurden Mäuseembryonen des Stammes NMRI der Tage 14 bis 17 untersucht.

Die Muttertiere wurden in temperatur- und feuchtigkeitsgeregelter Umgebung und bei gleichbleibendem Futter (Altromin, Standardfutter) gehalten.

Da bekannt ist, dass die Paarung bei Mäusen zwischen 24.00 und 2.00 Uhr nachts stattfindet, wurde aus arbeits- und untersuchungstechnischen Gründen der Tag-Nacht-Rhythmus der Tiere verändert, sodass der genaue Beginn der Schwangerschaft festgestellt werden konnte. Die Paarung erfolgte in der Zeit zwischen 7.30 und 9.30 Uhr im Prae-Oestrus der weiblichen Tiere. Der folgende Tag ist Tag 0 oder der 1. Tag. Eine genauere Angabe der Schwangerschaftsdauer gelingt durch die Angabe der Stunden, die seit 8.00 Uhr vergangen sind.

In dieser Arbeit werden Embryonen der Tage 11 + 8, 13 + 7, 14, 14 + 2, 15 + 2, 17 + 6 berücksichtigt.

Nach Tötung des Muttertieres und erfolgter Schnittenbindung wurden die Embryonen in toto nach CARNOY zwischen 6 und 24 Stunden, je nach Grösse der Embryonen, fixiert. Es handelt sich für die Lichtmikroskopie um ein Gemisch aus Alkohol (60%), Chloroform (30%) und Eisessig (10%). Es folgten zur Entwässerung Spülungen mit absolutem Alkohol, dann mit Methylbenzoat, schliesslich mit einem

Gemisch aus Methylbenzoat und Paraplast, denen die Einbettung mit Paraplast folgte.

Die Schnitte für das Lichtmikroskop wurden mit dem Paraffin-Mikrotom gefertigt. Für die Färbung auf dem Objektträger wurde Hämalaun-Eosin (HE), Perjog-Acid-Schiff's-Agens (PAS) und Masson-Goldner (M-G) verwendet. Die lichtmikroskopischen Aufnahmen wurden mit dem Zeiss-Photomikroskop Standard Universal angefertigt, Primärvergrößerung 20-, 40-, 64- und 160-fach.

Für die elektronenmikroskopischen Untersuchungen wurden die Embryonen in einer modifizierten Lösung nach KARNOVSKY (3% Formaldehyd, 3% Glutaraldehyd in Kakodylat-Puffer, pH 7,2) für 3 bis 4 Stunden fixiert. Daran schloss sich die Nachfixierung mit 1%iger OsO_4 -Lösung für eine Stunde an. Nach Entwässerung in der aufsteigenden Aceton-Reihe erfolgte die Einbettung in Micropal (Fa. Ferak, Berlin).

Die Dünnschnitte wurden mit LKB-Ultratomen und einem Reichert Omu II Ultramikrotom geschnitten und anschliessend mit Uranylacetat und Bleicitrat nachkontrastiert.

Die elektronenmikroskopischen Aufnahmen wurden mit dem Siemens Elmiskop I und Ia hergestellt. Die Primärvergrößerung beträgt 1 : 1000 bis 1 : 30 000. Die Positiv-Papiervergrößerungen sind 3 1/2 fach.

BEFUNDE

1. Lichtmikroskopie

Bei der Maus sind bereits am Tag 12 die wesentlichen Skeletteile, die über eine Ersatzknochenbildung aufgebaut werden, als Vorknorpelmodell angelegt. Andeutungsweise am Ende des Tages 13, deutlich aber am Tag 14, ist in den diaphysären Abschnitten der Röhrenknochen und in den Zentren der anderen Ersatzknochen, z.B. an der Schädelbasis, ein ausgeprägter Blasenknorpel vorhanden. Gleichzeitig beginnt nach unseren Untersuchungen die Mineralisation des Vorknorpels.

Da der Kalknachweis lichtmikroskopisch aber besonderer Methoden bedarf (COSSA, alkalische Phosphatase-Nachweis, TELLER et al. 1971), wurde für Routinezwecke nur das Auftreten des Blasenknorpels mit den üblichen Färbungen nachgewiesen. Das fast gleichzeitige Auftreten der Verkalkung kann auf Grund der elektronenmikroskopischen Befunde unterstellt werden.

In den folgenden Tagen lässt sich dann lichtmikroskopisch das Wandern der blasig veränderten Knorpelzellen nach epiphysenwärts verfolgen, bzw. von den zentralen Verkalkungspunkten in die Peripherie.

Lichtmikroskopisch-cytologisch ist der Blasenknorpel wenig ergiebig. Nachdem sich die riesigen Glykogen-Depots aufgelöst haben, zeigt sich eine vakuolige

Umwandlung des Cytoplasmas. Schliesslich fliessen die Vakuolen zusammen, die Wände fragmentieren, und ein eigentliches Cytoplasma lässt sich nicht mehr nachweisen. Der Kern bleibt noch relativ lange unverändert, meistens ohne vorher pyknotisch zu werden. Die Knorpelzellhöhlen erweitern sich dabei und drücken offenbar die Interzellulärsubstanz zusammen, wobei auch eine Verdichtung eintritt.

2. Elektronenmikroskopie

Bei elektronenmikroskopischer Betrachtung stellt sich die Entwicklung des Stützgewebes mit einem dichten Zellblastem dar. Die Zellen sind rund bis polygonal und zeigen nur wenige plumpe Fortsätze. Die Membranen benachbarter Zellen verlaufen auf weiten Strecken annähernd parallel nebeneinander her, in einem Abstand von ca. 200 Å. Die Vorknorpelbildung wird eingeleitet durch einen Differenzierungsprozess im Cytoplasma dieser Zellen. Während in den Blastemzellen die freien Ribosomen bzw. die gruppierten Ribosomen (Polysomen) das Bild beherrschen, entstehen jetzt zahlreiche langgestreckte Hohlräume des rauen endoplasmatischen Reticulum. Zahl und Grösse der Mitochondrien nehmen etwas zu, und der Golgi-Apparat wird grösser. Gleichzeitig werden ausserhalb der Zellen, meistens der Zellmembran dicht anliegend, die ersten

Strukturen des Extrazellulärtraumes sichtbar. Diese, von den Fibroblasten, Chondroblasten oder Osteoblasten im rauen endoplasmatischen Reticulum synthetisierten und dann sezernierten Grundsubstanzbestandteile liegen zunächst in niederpolymerer Form vor. Dann finden sich die Polypeptid-Ketten bzw. die Glucosaminglycan-Makromoleküle zu grösseren Einheiten zusammen: den kollagenen Filamenten (bis 150 Å Durchmesser und ohne Querstreifung) und kollagenen Fibrillen (grösser als 150 Å und mit Querstreifung). Durch die hohe Sekretionsaktivität dieser Mesenchymzellen wächst die Menge der Interzellulärsubstanz im Skelettblastem relativ schnell an und drängt die Zellen auseinander. Am Ende des Tages 11 hat sich typisches Knorpelgewebe gebildet, d.h. isolierte Zellen liegen in den Höhlen einer Interzellulärsubstanz, die zahlreiche kollagene Fibrillen enthält. Bei genauerer Analyse dieser Interzellulärsubstanz stellt sich heraus, dass es sich um etwa 150 bis 200 Å dicke kollagene Fibrillen handelt, die bei hoher Vergrösserung eine kontinuierliche Querstreifung aufweisen. Die Querstreifung wird gebildet durch etwa 100 Å breite helle und dunkle Bänder, senkrecht zur Längsrichtung der Fibrillen. Der Verlauf der Fibrillen ist völlig regellos, eine Bündelbildung oder angedeutete Vorzugsrichtung ist nur an wenigen Stellen zu erkennen. Neben diesen Kollagenstrukturen lassen sich auch noch die Glucosaminglycan-Makromoleküle darstellen.

Mit den üblichen Präparationsmethoden sind sie häufig nicht darstellbar. Nach Anwendung der Rutheniumrot-Methode stellen sie sich als dunkle etwa 200 bis 400 Å grosse Granula dar, die entweder mehr oder weniger direkt den Kollagenfibrillen anliegen oder unabhängig davon locker verteilt im interfibrillären Raum liegen. Von diesen dunklen Granula gehen teilweise feine Filamente (20 bis 60 Å) aus, die frei enden, sich untereinander berühren oder an die kollagenen Fibrillen heranziehen. Diese Struktur der Interzellularsubstanz bleibt bis zum Beginn der Mineralisation bestehen, jedoch nimmt die Menge der Interzellularsubstanz, d.h. der Abstand zwischen den Zellen noch weiter zu. Die Feinstruktur der Knorpelzellen verändert sich dagegen tiefgreifend. Zunächst kommt es noch zu einer leichten Vergrösserung der Zellen selbst, die mit einer Vermehrung der Hohlräume des rauen endoplasmatischen Reticulum und einer Vergrösserung des Golgi-Apparates einhergeht. Gleichzeitig formieren sich an der Zelloberfläche typische zipfelförmige Zellfortsätze, deren Enden fingerförmig unterschiedlich weit in die Interzellularsubstanz hineinragen. Dann beladen sich die Chondroblasten zunehmend mit Glykogen. Glykogen stellt sich im Elektronenmikroskop als dichtgepackte, nach Bleihydroxyd-Kontrastierung, sehr elektronendichte etwa 300 bis 500 Å grosse Granula dar (Gamma-Form). Diese Glykogene nehmen an Grösse zu und können bis zu 50%

des Cytoplasmas einnehmen. Die Zahl und Grösse der Zellorganellen verringert sich dabei. Dann lösen sich im Zentrum der Glykogeneinschlüsse die Granula auf, und es entsteht eine nicht membranbegrenzte Vakuole. Die Glykogenauflösung schreitet weiter fort, und die optisch leeren Räume nehmen zu. Gleichzeitig beginnen auch Lösungserscheinungen an den anderen Strukturen: die Membranen fragmentieren, ebenso die Zellmembranen, die Ribosomen und Ribosomen pro Polysom nehmen an Zahl ab. Schliesslich zerfällt die Zelle in immer kleinere Einheiten, deren Herkunft nicht mehr zu identifizieren ist. Das Cytoplasma verdämmert. Der Kern bleibt relativ lange erhalten, macht dann aber auch diesen Auflösungsprozess durch. Interessanterweise lässt sich an den Zelltrümmern eine grosse Zahl von GAG's nachweisen.

Der eigentliche Mineralisationsprozess des Vorknorpelmodells beginnt zu dem Zeitpunkt, zu dem sich die Glykogen-Placques der Chondroblasten in voller Auflösung befinden. Deutlich elektronenmikroskopisch zu erfassen ist der jetzt beginnende Vorgang der Kalkeinlagerung am Auftreten von Calcium-Apatit-Kristallen. Diese Kristalle sind etwa 50 Å dick, 100 Å breit und 400 bis 600 Å lang. Sie haben offenbar eine lanzettförmige Gestalt. Bei genauer Betrachtung zahlreicher Bilder zeigt sich, dass diesen ersten sicheren Merkmalen der Mineralisation einige ebenfalls morphologisch fassbare Vor-

gänge vorausgehen. Es handelt sich um Verdichtungen der interfibrillären Interzellulärsubstanz. Diese Verdichtungen sind vorwiegend rund, etwa 0,25 bis 1,5 μ im Durchmesser. An diesen Stellen lassen sich die ersten Calcium-Apatit-Kristalle nachweisen. Ihre Lage ist zunächst völlig regellos und zeigt trotz genauer Betrachtung keine Vorzugsrichtung. Durch immer neue Anlagerung liegen sie schliesslich so dicht gepackt, dass im Zentrum dieser Placques elektronenmikroskopisch keine Einzelheiten dargestellt werden können.

Zu diesem Zeitpunkt ordnen sich die in der Peripherie lokalisierten Kristalle deutlich radiär aus. Diese Lagerung der Calcium-Apatit-Kristalle wird jetzt während des weiteren Wachstums der Mineralisations-Placques immer beibehalten. In keiner Entwicklungsphase - weder während der ersten Ablagerung einzelner Kristalle noch während der vorwiegend radiären Ausrichtung der grossen Placques - findet sich im verkalkenden Vorknorpel eine deutliche und immer wiederkehrende räumliche Beziehung zu den kollagenen Strukturen. Die verdichteten Grundsubstanz-Bezirke mit den ersten Kalkkristall-Niederschlägen enthalten keine Fibrillen und im Bereich der grösseren Placques beobachtet man eine völlig unabhängiges und regelloses Verhalten der Kristalle in Bezug auf die kollagenen Fibrillen.

Die Kalkniederschläge können einen Durchmesser von 20 μ erreichen. Auch hier finden wir an der

Peripherie deutlich radiär gerichtete Kristalle, während im Zentrum entweder durch die dichte Packung keinerlei Einzelheiten erkannt werden können oder eine völlig regellose Lagerung vorherrscht.

Während der vakuoligen Umwandlung der Chondroblasten zu sog. Blasenknorpelzellen, die sich zu diesem Zeitpunkt ebenfalls abspielt, erweitern sich die Knochenhöhlen: die dazwischenliegende interzelluläre Substanz wird dabei offenbar etwas zusammengedrückt. Die sich in diesen Interzellularbezirken entwickelnden, vorwiegend drusenartigen Kalkniederschläge wachsen solange, bis sie an beiden Seiten die Knorpelhöhlen erreicht haben.

Ein weiteres Wachstum konnte niemals beobachtet werden, jedoch kommt es zum Zusammenfliessen der Kalkdrusen, sodass ein traubenartiges Bild entstehen kann. Diese, aus unterschiedlich grossen Einzeldrusen zusammengeflossenen Kalktrauben, können noch an Grösse zunehmen, wobei die Oberfläche verstreicht und ein einheitliches Gebilde resultiert, dessen zusammengesetzte Herkunft nicht mehr sicher zu erkennen ist. Zwischen den Kalk-einlagerungen bleiben wechselnd grosse kalkfreie Räume übrig, in denen man die Struktur der organischen Grundsubstanz mit ihren kollagenen Fibrillen noch deutlich erkennen kann.

DISKUSSION

Die kurze Tragezeit bei Mäusen (19 bis 20 Tage) erzwingt die kurze und zeitlich sehr zusammengedrückte Entwicklung während der Entstehung des embryonalen Organismus in utero. Dieses Verhalten fällt auch bei der lichtmikroskopischen Betrachtung der Skelettentwicklung auf.

Am späten Tag 11 oder frühen Tag 12 ist der Vorknorpel erstmals deutlich darzustellen, am späten Tag 13 oder am frühen Tag 14 findet man bereits an den meisten Stellen vakuolig umgewandelte Knorpelzellen, d.h. Blasenknorpel. In früheren Untersuchungen (MERKER 1968. STEINER 1972.) konnte gezeigt werden, dass zu dem Zeitpunkt, an dem lichtmikroskopisch der Blasenknorpel deutlich zu erfassen ist, bei elektronenmikroskopischer Betrachtung die ersten Mineralisationsvorgänge in der Knorpelgrundsubstanz bereits ablaufen. Es ist deshalb die Behauptung gerechtfertigt, dass im Verlaufe des Tages 14 die Mineralisation des Vorknorpels an allen Skelettstücken mit Ersatzknochenbildung in Gang kommt. Die Kenntnis dieser Zeitfaktoren ist für das experimentelle Arbeiten auf dem Gebiet der Teratologie und für die Deutung der Missbildungsentstehung von grosser Wichtigkeit. Es stellt sich immer mehr heraus, dass die klassischen, sog. kritischen Perioden, die wesentlich von den Proliferationsraten ausgehen, nicht alle Missbildungen zu erklären vermögen. Es muss zweifellos angenommen

werden, dass auch nach den Blastem-Stadien, ja sogar nach dem Vorknorpel-Stadium, noch Missbildungen entstehen können (MERKER 1972. SCHWEICHEL 1972). Bei diesen Fällen spielt die Mineralisation der Interzellulärsubstanz des Vorknorpels eine wesentliche Rolle. Während nämlich die zugehörigen Zellen absterben, wird durch die Stabilität der Knorpel-Interzellulär-Substanz die Information für Zahl, Grösse, Form und Lage der späteren Röhrenknochen weitergegeben. Diese Information wird an eine zweite Mesenchymzell-Generation vermittelt, die auf dieser teilweise azellulären Schablone einen neuen Mesenchym-Verband bildet. Der Reiz für das Einwandern neuer Mesenchymzellen und für den Abbau der älteren Interzellulärsubstanz wird mit grosser Wahrscheinlichkeit durch mineralisierte Vorknorpel-Grundsubstanz erzeugt. Ist diese Interzellulärsubstanz fehlerhaft aufgebaut oder nicht mineralisiert, ist das Knorpelmodell insuffizient, so kann es dadurch zu Missbildungen kommen. Da aber die meisten teratogenen Substanzen während der sog. kritischen Periode gegeben werden, von Tag 8 bis 12 bei der Maus, ist der eben geschilderte Mechanismus bei der Missbildungsentstehung an den langen Röhrenknochen nur wenig bekannt und wird deshalb meistens nicht berücksichtigt. Darüberhinaus sind hier auch die klassischen teratogenen Substanzen, die meistens auf der Ebene der Replikation, Transskription oder Translation wirksam

sind, für diesen speziellen Missbildungsmechanismus nicht geeignet. Hier könnten nur Substanzen wirksam werden, die in irgendeiner Weise an der Bildung und Reifung der Interzellulärsubstanz des Knorpels oder am Mineralisationsprozess des Vorknorpels angreifen. Voraussetzung zum Verständnis und zur Deutung solcher Störungsmöglichkeiten ist natürlich die Kenntnis der normalen Verhältnisse, die deshalb von uns in dieser Arbeit durchgeführt wurde. Unter den geschilderten Bedingungen könnte also der Tag 14 bei der Maus ebenfalls noch als kritische Periode bezeichnet werden.

Bei einem Vergleich der Interzellulärsubstanz des verkalkenden Vorknorpels mit der des typischen Bindegewebs- oder Lamellenknochens fallen charakteristische Unterschiede ins Auge. Der ausgereifte Knochen mineralisiert eine reife Interzellulärsubstanz, die aus dicken und dichtgepackten kollagenen Fibrillen besteht. Darüberhinaus sind diese Fibrillen in einer Textur angeordnet, d.h. wir finden hier Fibrillenbündel, die ganz charakteristische Anordnungen haben. Die Fibrillendicke des Vorknorpels ist dagegen gering. Eine Ordnung zu Bündeln oder übergeordneten Texturen liegt nicht vor (KNESE 1957, 1959, 1963. KNESE u. KNOOP 1958, 1960, 1961. MERKER 1968. Steiner 1972). Die Menge der GAG-Makromoleküle ist dagegen viel grösser als in den übrigen

Skelettstücken. Dieses morphologische Verhalten - dünne Fibrillen ohne deutliche Textur und viele GAG-Makromoleküle - ist typisch für unreifes Bindegewebe. Es muss aber auf Grund der Befunde an reifen Knochen, bei denen eine geordnete räumliche Beziehung zwischen Kollagen-Fibrillen und Apatit-Kristallen besteht, angenommen werden, dass für eine typische Kollagen-Apatit-Beziehung eine reife Kollagen-Fibrille Voraussetzung ist. Diese Vorstellung wird durch Befunde bestätigt, die während der desmalen Ossifikation erhoben wurden (STEINER 1972). Hier konnte nämlich gezeigt werden, dass die Mineralisation ebenfalls in einer unreifen Interzellulärsubstanz beginnt. Die Kristallablagerung zeigt deshalb keinerlei Beziehungen zu den kollagenen Fibrillen. Mit zunehmender Reifung, d.h. Dickerwerden der Fibrillen und Ausbildung der Textur, tritt eine Anlagerung der Kristalle an die Fibrillen ein. Schliesslich haben sich die typischen Beziehungen voll ausgebildet. Aus diesen Gründen ist es durchaus verständlich, dass in der Interzellulärsubstanz des Vorknorpels, die vom morphologischen Standpunkt aus noch unreifer ist als die der desmalen Ossifikation, ein Mineralisationsmuster ohne Beziehung zur kollagenen Fibrille zeigt.

Wenn die kollagene Fibrille wegen ihrer Unreife, die morphologisch durch die geringe Dicke deutlich wird, nicht als Abscheidungsart für die Calcium-

-Apatit-Kristalle geeignet ist, müssen andere Substanzen und Lokalisationen für das Zustandekommen des Mineralisationsprozesses verantwortlich gemacht werden. Hierfür käme der zweite Hauptbestandteil der mesenchymalen Interzellularsubstanz, die Glucosaminglycane in Frage. Bei genauer elektronenmikroskopischer Analyse stellt sich tatsächlich heraus, dass sie in den Bereichen zwischen den Fibrillen, also dort wo die GAG's lokalisiert sein müssten, liegen.

Zu anderen Theorien des Mineralisationsvorganges - z.B. die Bildung von Phosphaten durch eine alkalische Phosphatase, die Beseitigung einer Hemmsubstanz oder die aktive Sekretion durch die Knorpelzellen - kann morphologisch nichts Sicheres ausgesagt werden (TELLER et al. 1971). Wenn aber Beziehungen zu Bestandteilen in der Interzellularsubstanz bestehen, kommen nach unseren Befunden am ehesten die Glucosaminglycane in Frage.

Die immer wieder vermutete räumliche Beziehung der Zellfortsätze zu den ersten Mineralisationsherden konnten wir in unseren Bildern nicht bestätigen.

In einem wesentlichen Punkt unterscheidet sich die Mineralisation des Vorknorpels von anderen Mineralisationsvorgängen: hier sterben zum Zeitpunkt der Mineralisation die verantwortlichen Mesenchymzellen ab, während z.B. bei der desmalen oder chondralen Ossifikation die Zellen (Osteoblasten, Chondroblasten) vital und sehr aktiv sind.

Dieses Verhalten berechtigt natürlich zu der Frage, ob die Verkalkung durch die Nekrose der Knorpelzellen hervorgerufen wird, also zum Typ der Verkalkung in abgestorbenen Geweben gehört, die aus der Pathologie wohlbekannt ist (WOLFF 1967, 1968). Diese Frage kann morphologisch ebenfalls nicht sicher beantwortet werden. Jedoch wären auch bei einem solchen Verkalkungstyp der Mechanismus und die Ursachen der Mineralisation unbekannt.

ZUSAMMENFASSUNG

Es wurde licht- und elektronenmikroskopisch die normale Mineralisation des Vorknorpels bei der Maus untersucht.

Verwendet wurden Mäuse-Embryonen (Stamm NMRI) der Tage 11 bis 17.

Die lichtmikroskopischen Befunde zeigen, dass am Tag 12 das Vorknorpelmodell für alle späteren Ersatzknochen bereits vorhanden ist. Der Beginn der Verkalkung wird nach unseren Untersuchungen mit lichtmikroskopischen Methoden mit dem Auftreten des Blasknorpels gleichgesetzt. Bei der Maus ist vereinzelt am späten Tag 13, deutlich aber am Tag 14 Blasknorpel vorhanden. Nach Auflösung der Glykogen-Depots wandelt sich das Cytoplasma der Vorknorpelzellen vakuolig um. Die Vakuolen fliessen schliesslich zusammen, sodass Cytoplasma nicht mehr nachweisbar ist.

Bei elektronenmikroskopischer Untersuchung zeigt sich, dass die Mineralisation des Skelettes mit einem dichten Zellblastem beginnt. Im Cytoplasma dieser Zellen werden die Substanzen synthetisiert, die dann in den Extrazellulärraum abgegeben werden: Glucosaminglycan-Makromoleküle, kollagene Filamente mit einem Durchmesser bis 150 Å, aber ohne Querstreifung und kollagene Fibrillen mit einem Durchmesser über 150 Å, aber mit Querstreifung. Die Chondroblasten beladen sich mit Glykogen, das später wieder aufgelöst wird, und schliesslich degenerieren sie vakuolig.

Gleichzeitig beginnt der Verkalkungsprozess durch Einlagerung von Calcium-Apatit-Kristallen an Verdichtungsstellen der Interzellulärsubstanz. Die Kristalle liegen zunächst regellos, erfahren später aber in der Peripherie eine radiäre Ausrichtung.

Diskutiert werden vorwiegend:

1. Der Zeitpunkt der Mineralisation des Vorknorpels im Hinblick auf Missbildungen am Skelett (sog. kritische Periode).
2. Verschiedene Theorien über die Mineralisation, die nach unseren Befunden dort beginnt, wo die Glucosaminoglycane lokalisiert sind.

LITERATUR

- Bachra, B.N.,
A.E. Sobel and
J.W. Stanford Mineralization of collagen
and other fibers.
Arch.Biochem.and Biophys.84,
79-95, 1959.
- Bargmann, W. Histologie und mikroskopische
Anatomie des Menschen.
G. Thieme Verl.Stuttgart. 4.Aufl.
127-166 u. 235-242, 1962.
- Beneke, G. Modelluntersuchungen zur Reaktion
zwischen Mucopolysacchariden und
Bluteiweisskörpern.
Verh.Dt.Ges.Pathol., 48. Tagg.
306-309, 1964.
- Bernard, W. and
C. Pease An electron microscopic study of
initial intramembranous osteo-
genesis.
Am.J.Anat. 125, 271-290, 1969.
- Bonucci, E. Fine structure of early cartilage
calcification.
Ultrastructure Res., 20, 33-50,
1967.
- Bucher, O. Histologie und mikroskopische
Anatomie des Menschen.
Verl. H. Huber, Bern/Stuttgart,
3. Aufl. 1962, 134-182.
- Cabrini, R.L. Histochemistry of calcification.
Int.Rev.Cytol. 11, 283-306, 1961.
- Cameron, D.A. The fine structure of bone and
calcified cartilage.
Clin.Orthrop., 26, 199-228, 1963.
- Dulce, H.J. Zur Biochemie der Verknöcherung.
I - III.
Hoppe-Seylers Zschr.physiol.Chem.
319, 257-278, 1960 u. 320, 1-10,
1960.

- Eger, W. Der Mineralisationsvorgang des Knochengewebes und seine Störungen.
Verh.dt.orthop.Ges., F.Enke Verl. Stuttgart 1961, 129-151.
- Über die Mineralisation des Knochengewebes unter Berücksichtigung autoradiographischer Befunde.
Acta histochem. (Jena), Suppl.3., 16-27, 1963.
- Fleisch, H. Neue Gesichtspunkte der Kalkablagerung.
Schweiz.med.Wschr. 858, 1961.
- Die Mineralisation.
In: Binde- u. Stützgewebe.
D. Steinkopff, Darmstadt 1966., 171-174.
- Foik, M. Das elektronenmikroskopische Bild des Meckel'schen Knorpels bei der Ratte bis zur Geburt.
Diss. FU-Berlin, 1970.
- Freudenberg, E. and P. György Der Verkalkungsvorgang bei der Entwicklung des Knochens.
Ergeb.d.inn.Med., Kinderheilk. 24; 17-28, 1924.
- Giesecking, R. Über die faserige Differenzierung des Mesenchyms in frühen Stadien der Entwicklung.
Verh.Dt.Ges.Path., 43.Tagg., 56-61, 1959.
- Glimcher, M.J. Specifity of the molecular structure of organic matrices in mineralization.
Amer.Ass.Adv.Sci., 64, 421-487, 1960.
- Grosser, O. u. R. Ortmann Grundriss der Entwicklungsgeschicht des Menschen.
Springer Verl., Berlin etc. 6. Aufl. 1966.

- Keibel, F. Normentafeln zur Entwicklungs-
geschichte der Wanderratte (*rattus*
norvegicus Erxleben).
Verl. G. Fischer, Jena 1937.
- Knese, K.H. Die diaphysäre chondrale Osteo-
genese bis zur Geburt.
Z. Zellforsch., 47, 80-113, 1957.
- Neuere Untersuchungen über die
Knochenbildung und ihre Beein-
flussungsmöglichkeiten.
Dt.zahnärztl.Z. 14/15, 925-932,
990-1000, 1959.
- Über die Mineralablagerungen im
Knorpel- und Knochengewebe unter
Berücksichtigung elektronenmikros-
kopischer Befunde.
Acta histochem. (Jena) ., Suppl. 3,
31-56, 1963.
- Knese, K.H. u.
A.M. Knoop Elektronenoptische Untersuchungen
über die periostale Osteogenese.
Z. Zellforsch. 48, 455-478, 1958.
- Elektronenmikroskopische und
histochemische Untersuchungen am
Knorpelgewebe über den Ort der
Bildung des Mucopolysaccharid-
-Protein-Komplexes.
Z. Zellforsch. 53, 201-258, 1960.
- Chondrogenese und Osteogenese.
Z. Zellforsch. 55, 413-468, 1961.
- Langmann, J. Medizinische Embryologie.
G. Thieme Verl., Stuttgart 1970.
- Leonard, F. and
R.I. Scullin New mechanism for calcification of
skeletal tissues.
Nature (Lond.) 224, 1113, 1969.
- Lipp, W. Blood serum proteins and the
mineralization of bone ground
substance.
Histochem. 9, 339-353, 1967.

Majno, G. u.
Ch. Rouiller

Die alkalische Phosphatase in
der Biologie des Knochengewebes.
Virchows Arch.path.Anat. 321,
1-61, 1951.

McLean, F.C. and
W. Bloom

Calcification and ossification.
Calcification in normal growing
bone.
Anat.Rec. 78, 333-359, 1940.

Merker, H.J.

Die Lysosomen, eine neue Zell-
organellgruppe.
Berlin.Med. 15, 237-244, 1964.

Das elektronenmikroskopische Bild
des grunds substanzarmen Knorpels
in den Schwanzflossen von
Petromyzon fluviatilis.
Z.Zellforsch. 70, 554-568, 1966.

Das elektronenmikroskopische Bild
des Blasenknorpels.
Verh.Anat.Ges. 121, 101-307, 1968.

Neuere Vorstellung über den
Mechanismus der Missbildungs-
entstehung.
Verh.Anat.Ges. 1972 (im Druck).

Lehrbuch der Anatomie des Menschen.
Knorpel- und Knochengewebe.
Urban u. Schwarzenberg, München etc.
1972, Bd. I.

Merker, H.J. und
Th. Günther

Elektronenmikroskopische Unter-
suchungen an einigen Rattenorganen
im Mg-Mangelzustand.
Z.klin.Chem.u.klin.Biochem. 8.Jg.
71-76, 1970.

Novak, L. u.
H.J. Merker

Zum Problem der Kalkablagerung in
der Zahnpulpa (elektronenmikros-
kopische Untersuchungen).
Schweiz.Mschr.Zahnheilk. 81,
464-476, 1971.

- Neumann, W.F. and
M. Neumann
The nature of the mineral
phase of bone.
Chem.Rev. 53, 1-45, 1953.
- Robinson, R.A.
An electronic-microscopic study
of the crystalline inorganic
component of bone and its
relationship to the organic
matrix.
Divis.of orthop.Surg. 34 A, Nr.2,
389-435, 1952.
- Romeis
Architektur des Knorpels vor der
Osteogenese und in der ersten
Zeit derselben.
Arch.Entw.-Mech. 31, 387-422, 1911.
- Santanam, M.S.
Calcification of collagen.
J.Molec.Biol. 1, 65-68, 1959.
- Schwarz, W.
Elektronenmikroskopische Unter-
suchungen über die Bildung
elastischer Fasern in der
Gewegekultur.
Z.Zellforsch. 63, 636-643, 1964.

Fibrillogenese und Bildung der
elastischen Fasern.
Arch.Biol.(Liège) 75, 369-370,
1965.

Elektronenmikroskopische Unter-
suchungen an Lysosomen im Blastem
der Extremitätenknospe der Ratte.
Z.Zellforsch. 73, 27-36, 1966.
- Schweichel, J.U.
Die Veränderung in der Inter-
zellulärsubstanz des Vorknorpels
nach Applikation von Vit. A.
Proc.2 longs.Europ.Teratol.Soc.,
Prag 1972 (im Druck).
- Starck, D.
Embryologie.
G. Thieme Verl., Stuttgart 1965.

- Steiner
Elektronenmikroskopische Untersuchungen über die desmale Osteogenese bei Rattenembryonen.
Diss. FU-Berlin 1972.
- Strates, B. and
Neumann, W.F.
On the mechanism of calcification.
Proc.Soc.Exp.Biol.Med. 97,
688-691, 1958.
- Strong, R.M.
The order, time and rate of ossification of the albino rat skeleton.
Amer.J.Anat. 36, 313-355, 1925.
- Taves, D.R.
Mechanism of calcification.
Clin.Orthop. 42, 207-221, 1965.
- Teller, C.,
H.J. Merker u.
Th. Günther
Über das Verhalten und die Lokalisation der alkalischen Phosphatase während der Skelettentwicklung bei Rattenfoeten.
Histochem. 27, 193-204, 1971.
- Urist, M.R.
Origins of current ideas about calcification.
Clin.Orthop.Rel.Res. 44, 13-39, 1966.
- Veis, A.,
A.R. Spector and
D.J. Carmichael
The organization and polymerization of bone and dentin collagens.
Clin.Orthop. 66, 188-211, 1969.
- Walker, D.G. and
Z.T. Wirtschafter
The genesis of the rat skeleton. A laboratory atlas.
C.C. Thomas ed. 1957.
- Wolff, H.
Über die Beteiligung von Serumproteinen an heterotopen Verkalkungen.
Verh.Anat.Ges. 121, 309-312, 1968.
- Wolff, H.H.
Histochemical studies on experimental heterotopic calcification.
Histochem. 9, 354-366, 1967.

Youssef, E.H.

Development of the membrane bones
and ossification of the chondro-
cranium in the albino rat.
Acta anat. 72, 603-623, 1969.

Zambotti, V.

Die Biochemie des Knorpels, der
zum Knochen umgebaut wird, und
die Verknöcherung.
Sci.med.ital. 5, 630-660, 1957.

B i l d m a t e r i a l

- Abb. 1. a. Schrägschnitt durch die obere Extremität eines Mäuseembryos vom Tag 15 + 2. Beginnende Blasenknorpelbildung im diaphysären Bereich des Humerus (↑).
- b. Mäuseembryo Tag 15 + 2. Blasenknorpel im Bereich der Wirbelsäulenanlage. N = Neuralrohr.
- c. Mäuseembryo Tag 15 + 2. Diaphysärer Bereich des Humerus. Typischer Blasenknorpel mit verdämmernden Zellen (↑), erweiterten Knorpelzellhöhlen und zusammengedrängten Interzellularräumen.
- d. Mäuseembryo Tag 15 + 2. Schrägschnitt durch den Humerus mit ruhendem Knorpel (I), Säulenknorpel (II) und Blasenknorpel (III).

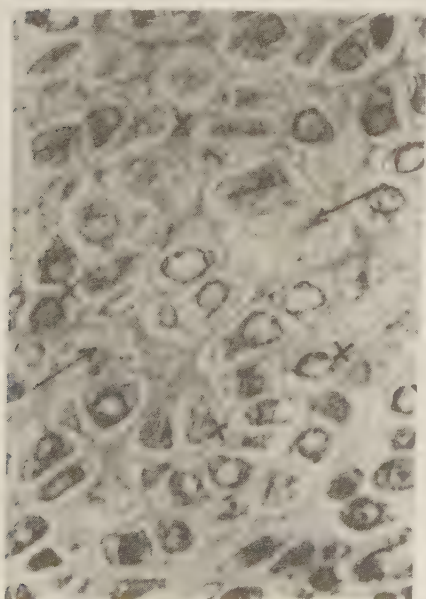
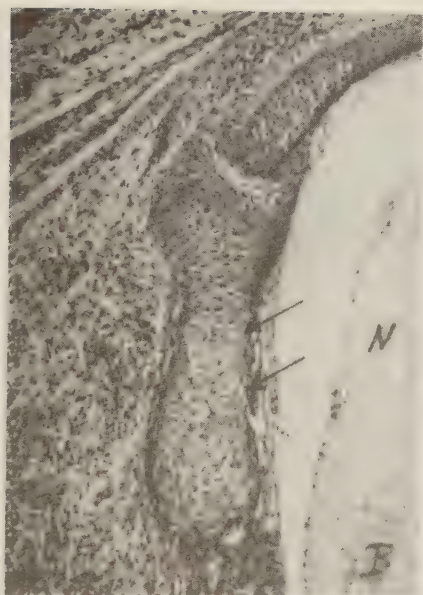


Abb. 2. Mäuseembryo Tag 15.

Humerus im Bereich der perichondralen
Knorpelmanschette in der Diaphyse (P).
Vorknorpelzellen in Auflösung (K),
filamentäre Interzellulärsubstanz (I)
mit kleinen (↑) und grösseren (X) Kalk-
niederschlägen.

O = perichondrale Osteoblasten.

Vergrößerung 1 : 3500.

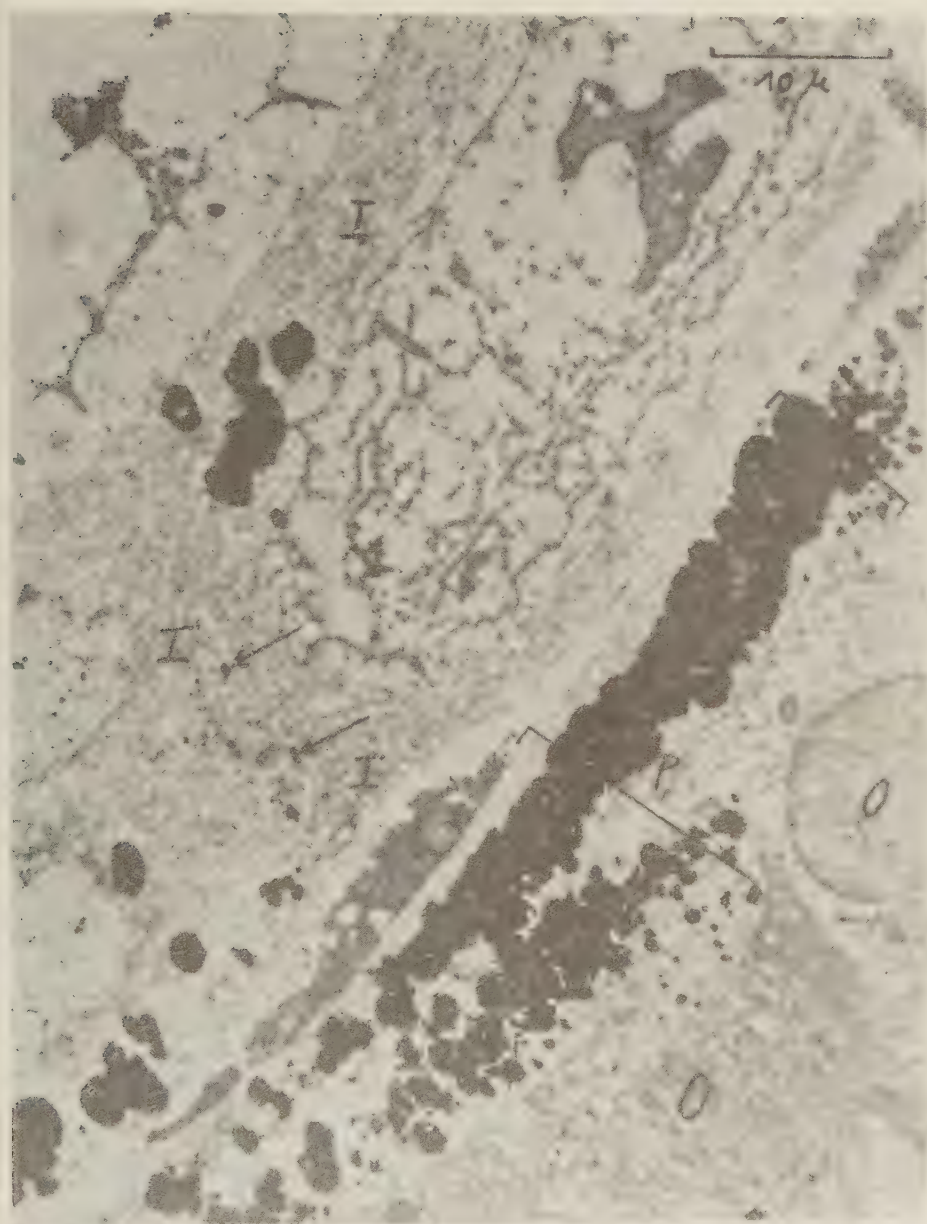


Abb. 3. Mäuseembryo Tag 15.

Humerus (wie 2).

Übersichtsbild aus dem zentralen Bereich des Blasenknorpels mit Vorknorpelzellen in Auflösung (K), schmalen Interzellularsepten (I) und bereits zusammenfliessenden Kalkdrüsen (X).

Vergrößerung 1 : 3500.

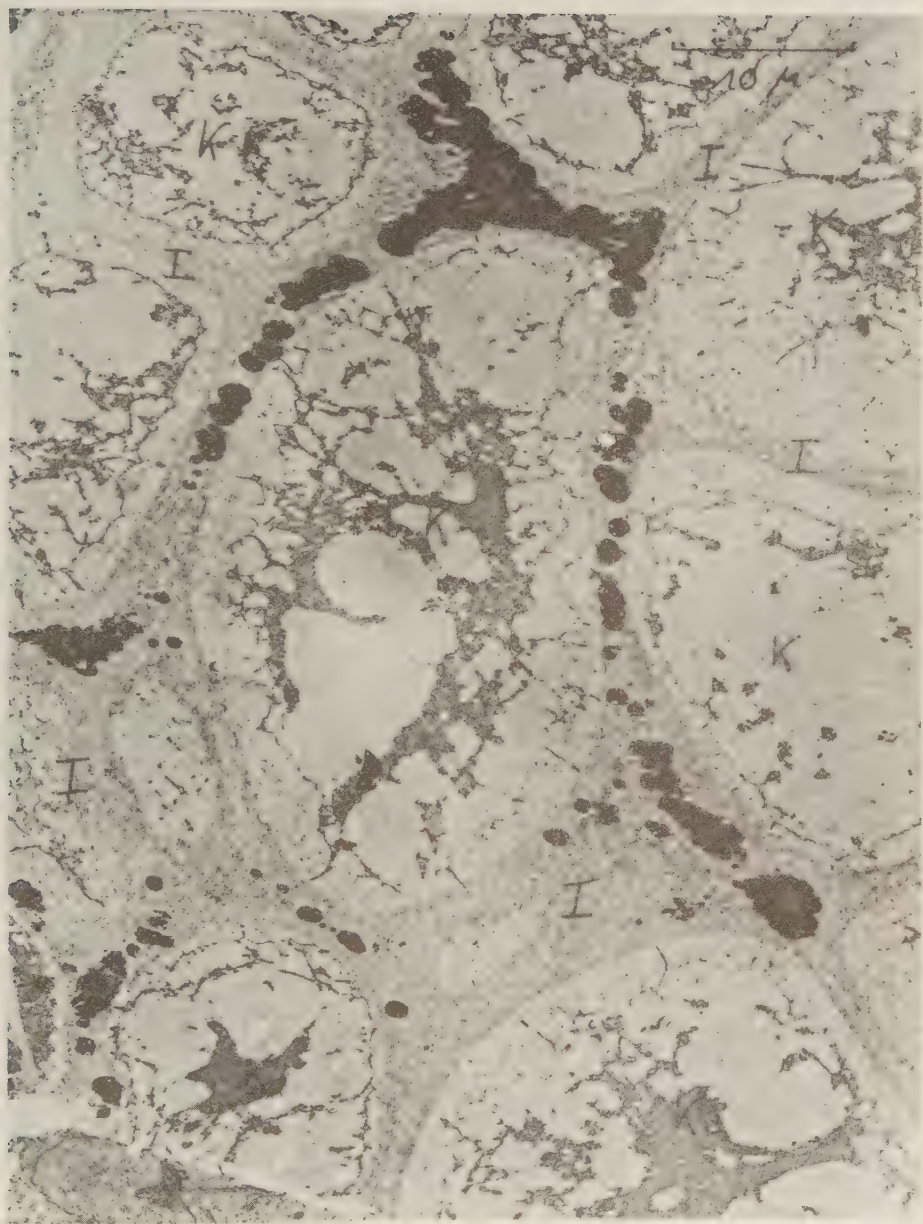


Abb. 4. Mäuseembryo Tag 15.

Humerus.

Sich weiter auflösende Vorknorpelzellen
(K), schmalen Interzellularsepten (I)
und zusammenfliessenden Kalkdrusen (X).
Vergrößerung 1: 11000.

μ

I

I

I

Abb. 5. Mäuseembryo Tag 15.

Humerus.

Höhere Vergrößerung der Interzellular-
substanz mit feinen Filamenten (↑),
elektronendichten Placques (X) mit ersten
Calcium-Apatit-Kristallen (✕) und grösseren
Kalkdrusen (D).

Vergrößerung 1 : 105 000.

0.1 μ

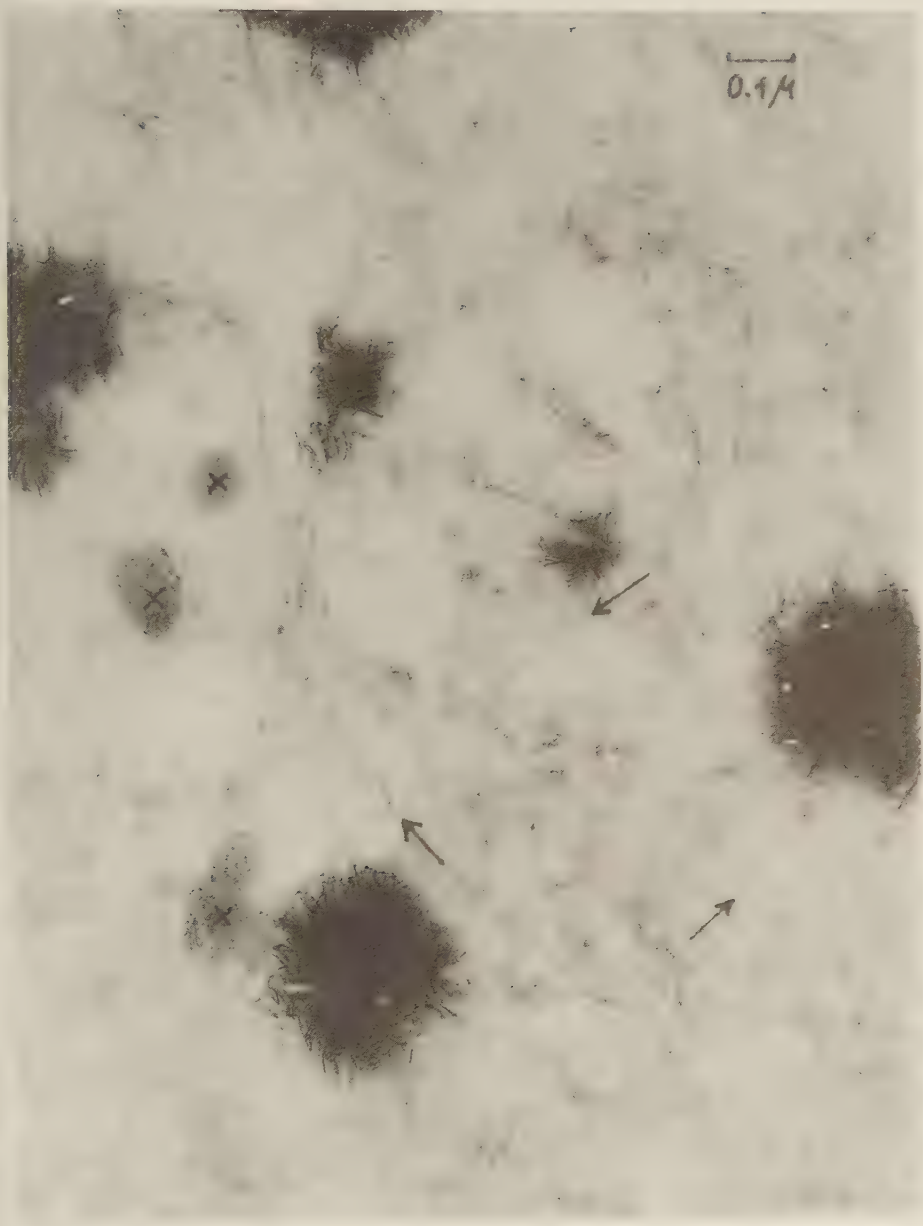


Abb. 6. Mäuseembryo Tag 15.

Humerus.

Interzellulärsubstanz des Vorknorpels
mit ersten Niederschlägen der Calcium-
-Apatit-Kristalle auf einer dichteren
Matrix (X).

Vergrößerung 1 : 105 000.

0.1 μ

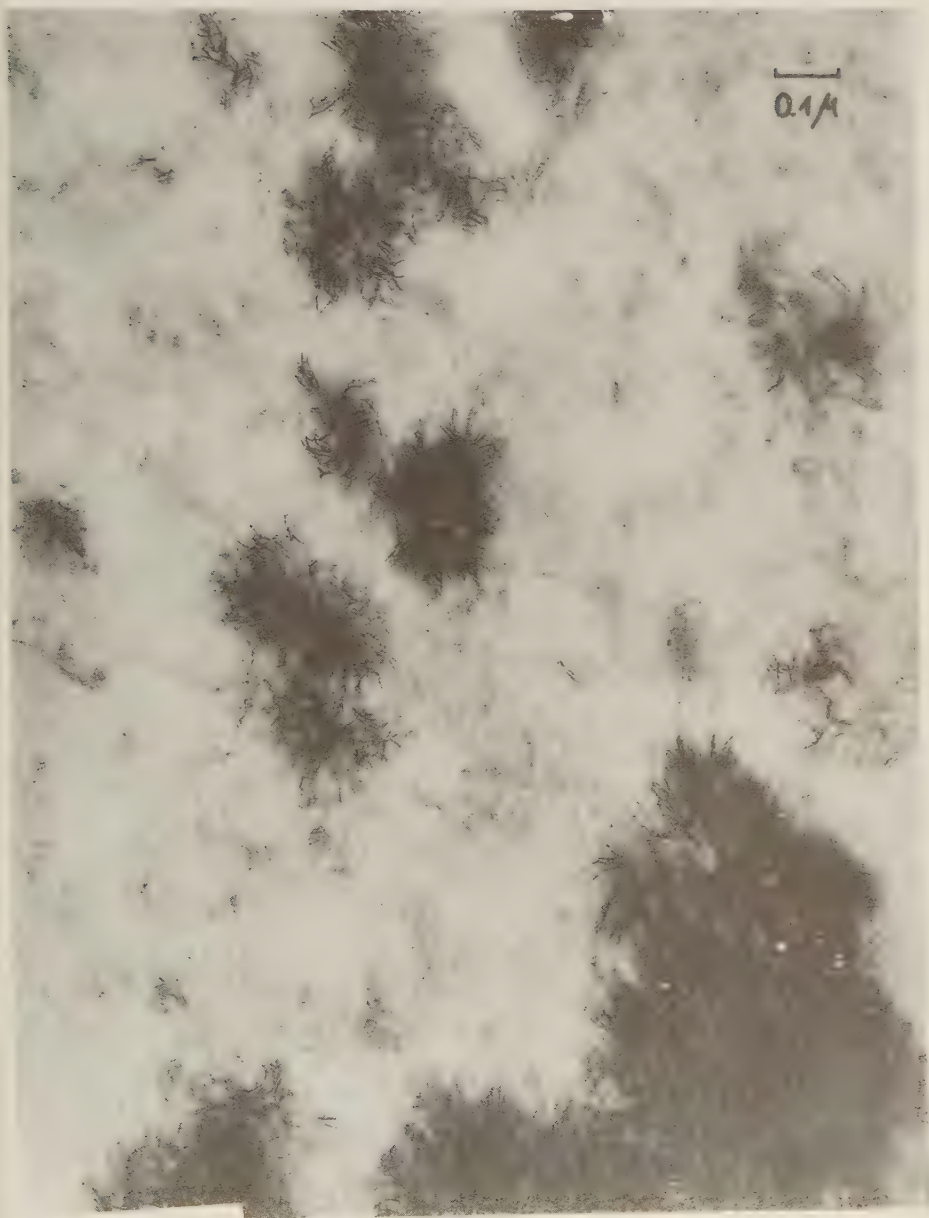


Abb. 7. Mäuseembryo Tag 15.

Humerus.

Höhere Vergrößerung einer sich bildenden
Kalkdrüse mit Darstellung der Einzelkristalle
und der kollagenen Strukturen im Hintergrund.
Vergrößerung 1 : 170 000.

—
0.1 μ

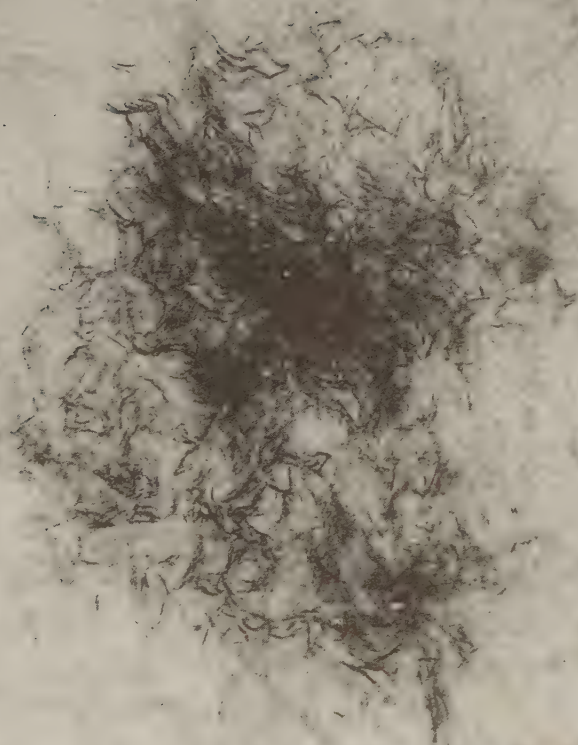


Abb. 8. Mäuseembryo Tag 15.

Humerus.

Randbereiche einer voll ausgebildeten
Kalkdruse mit unregelmässiger Lagerung
der Kristalle im Innern und angedeutet
radiärer Lagerung in der Peripherie.
Vergrösserung 1 : 105 000.



Herrn Prof. Dr. med. H. J. Merker danke ich für
die Überlassung des Themas "Mineralisation des
Vorknorpels. - Das elektronenmikroskopische Bild
des verkalkenden Vorknorpels bei Mäuseembryonen."

L e b e n s l a u f

Am 27. IX. 1941 wurde ich als Tochter des Arztes Dr. Hans Wodtke und seiner Frau Elisabeth, geb. Westphal in Mohrungen geboren.

Nach fünfjähriger Grundschulzeit besuchte ich die Viktoria-Luise Schule in Hameln/Weser, an der ich im März 1963 die Reifeprüfung ablegte.

Im Wintersemester 1963/64 begann ich mit dem Studium der Biologie, Germanistik und christlichen Archäologie an der Philipps-Universität in Marburg/Lahn. Im Wintersemester 1964/65 setzte ich an der Freien Universität Berlin das Studium zunächst mit Zahnmedizin fort, um im folgenden Semester mit dem Studium der Human-Medizin anzufangen.

Im Oktober 1967 bestand ich das Physikum, im Februar 1971 das Staatsexamen.

Am 1. V. 1971 begann ich die Medizinalassistentenzeit im Städtischen Krankenhaus Neukölln.

Seit dem 1. X. 1971 arbeite ich als Medizinalassistentin in der Forschungsabteilung für Elektronenmikroskopie der Freien Universität Berlin.

